



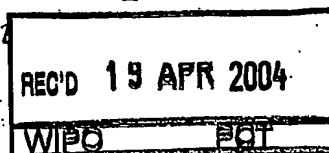
25. 03. 2004

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

Invenzione Industriale

N. FI2002 A 000239



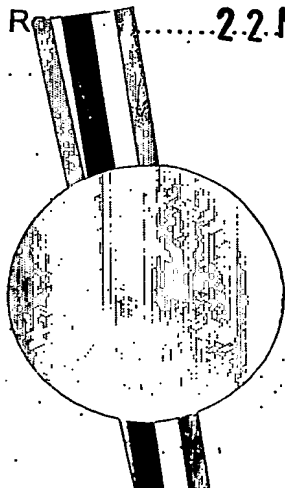
Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

EPO - DG 1

25. 03. 2004

(67)

Re 2.2. MAR. 2004



IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotta

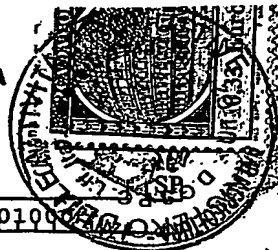
Giampietro Carlotta

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE. DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione MENARINI RICERCHE S.P.A.

Residenza POMEZIA (ROMA)

codice

0155000100

2) Denominazione

Residenza

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Brazzini Silvia

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza NOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.

via Lungarno Amerigo Vespucci

n. 24

città FIRENZE

cap 50123

(prov) FI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n.

città

cap

(prov)

D. TITOLO

classe proposta (naz/cl/sci)

C97K

gruppo/sottogruppo

9/1/00

Processo per la preparazione di composti peptidici biciclici.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) SALIMBENI Aldo

3) TUROZZI Damiano

2) POMA Davide

4) MANZINI Stefano

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1)

2)

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1)

12

PROV

n. pag. 46

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

Doc. 2)

0

PROV

n. tav. 100

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

Doc. 3)

1

RIS

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

Doc. 4)

0

RIS

designazione inventore

Doc. 5)

0

RIS

documenti di priorità con traduzione in italiano

Doc. 6)

0

RIS

autorizzazione o atto di cessione

Doc. 7)

0

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale lire

Euro Duecentonovantuno/80=

obbligatorio

COMPILATO IL 10/12/2002

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)

NOTARBARTOLO & GERVASI spa

CONTINUA SI/NO SI

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

CAMERA DI COMMERCIO I. A. A. DI

FIRENZE

codice 48

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

FI 2002A000239

L'anno millenovecento

DUENTILADUE

il giorno

SEI

del mese di

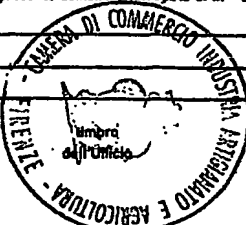
DICEMBRE

Il(i) richiedente(i) sopraddetto(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 01 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicata.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

NESSUNA

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE

Fusilli

11.6

[illegible]

COGNOME NOME

COGNOME NOME

[illegible]

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domeniche

දත්ත ගිණුම

allegato
S/n

[illegible]

SCIoglimento RISERVE

Data**Nº Protocollo**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	8												

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

~~NOTARE ARTOLO & GERVASI spa~~

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRELIMINARE

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

MENARINI RICERCHE S.P.A.

Residenza

POMEZIA (ROMA)

B. TITOLO

Processo per la preparazione di composti peptidici biciclici.

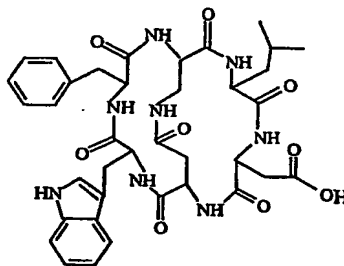
Classe proposta (sez./cl./scl) C07K

(gruppo/sottogruppo) 9.100.

L. RIASSUNTO

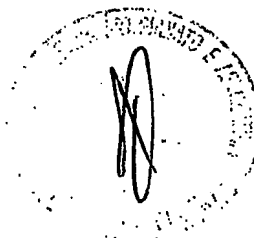
La presente invenzione riguarda un nuovo processo condotto completamente in soluzione, per la preparazione in alte rese di composti peptidici biciclici di formula (I) di elevata purezza, utili come intermedi per la preparazione di composti aventi attività farmacologica:

Ciclo(Asp(OH)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu)



(I)

M. DISEGNO



Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo :

"Processo per la preparazione di composti peptidici biciclici"

a nome : MENARINI RICERCHE S.p.A.

con sede in : ROMA

Inventori designati : Aldo SALIMBENI, Davide POMA, Damiano TUROZZI, Stefano MANZINI, Carlo Alberto MAGGI

Depositata il _____ con il n° _____

* * * * *

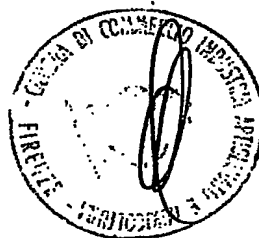
CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda un nuovo processo per la sintesi di composti peptidici biciclici di formula (I) più avanti riportata, utili come intermedi nella preparazione di composti ad attività farmacologica, ed in particolare per la preparazione di glicopeptidi biciclici di formula (I-A) più avanti riportata, che possiedono attività antagonista del recettore NK2 di tachichinine.

STATO DELL'ARTE

I composti di formula (I-A) e in particolare il composto [N-4-(2-acetilammino-2-deossi- β -D-glucopiranosil)-L-asparaginil-L- α -aspartil-L-triptofil-L-fenilalanil-L-2,3-diamminopropionil-L-leucil]-C-4,2-N-3,5-lattame-C-1,6-N-2,1-lattame (composto di formula (I-A) sotto riportata in cui $R_1 = R_2 = R_3 = H$, noto con il nome commerciale "Nepadutant") sono composti dotati di una potente attività antagonista del recettore NK₂ di tachichinine, e possono pertanto essere usati per la preparazione di composizioni farmaceutiche per il trattamento di malattie utili nella cura e

FI 26024000239



nella prevenzione di malattie in cui siano implicate le tachichinine come neuromodulatori.

Tale composto e alcuni suoi intermedi sono descritti nel brevetto EP B1 N. 815 126, in particolare nell'Esempio 4. In tale documento, alle pagine 4 e 5, si descrive come per ottenere composti di formula generale (I) sia possibile utilizzare, secondo quanto già noto in letteratura, il metodo della sintesi in soluzione oppure il metodo della sintesi in fase solida di peptidi lineari mediante accoppiamento sequenziale di amminoacidi opportunamente protetti e loro successiva ciclizzazione finale.

Tali metodi sono stati descritti in modo assolutamente generale, mentre maggiori dettagli sono stati forniti per la realizzazione dei composti degli Esempi 1 e 2. In questi esempi la sintesi utilizzata è stata quella dell'accoppiamento in fase solida di Fmoc amminoacidi fino all'ottenimento di un peptide lineare che, una volta sganciato dalla resina, viene ciclizzato, purificato su HPLC e nuovamente ciclizzato. E' importante notare che, secondo questa via sintetica, il pendaglio glicosidico viene introdotto a livello della sintesi in fase solida del peptide lineare sulla resina, come catena laterale opportunamente protetta della Asparagina.

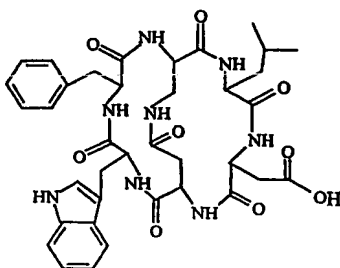
SOMMARIO

Ora la Richiedente ha sorprendentemente trovato un nuovo e più efficiente processo di sintesi di composti peptidici biciclici di formula (I) più avanti riportata, utili come intermedi per la preparazione di composti ad attività farmacologica.

Il nuovo processo è condotto completamente in soluzione anziché in fase solida e consente di ottenere prodotti di elevata purezza in alte rese.

Rappresenta pertanto oggetto della presente invenzione un processo per la preparazione dei composti peptidici biciclici di formula (I)

Ciclo(Asp(OH)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu)



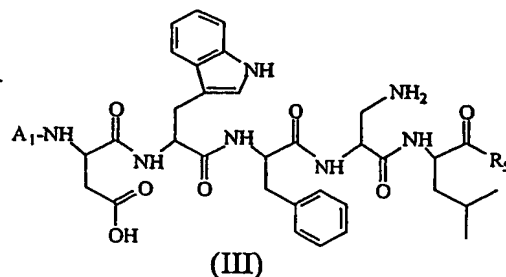
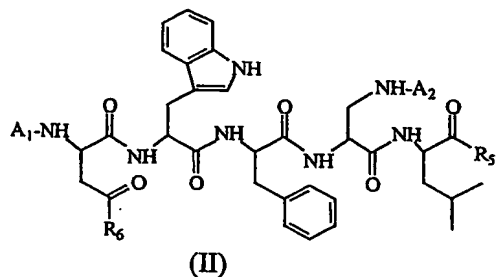
(I)

comprendente i seguenti stadi:

1) deprotezione del pentapeptide lineare di formula (II) in presenza di un solvente per dare il composto di formula (III):

A_1 -Asp(R_6)-Trp-Phe-Dpr(A_2)-Leu- R_5

A_1 -Asp(OH)-Trp-Phe-Dpr(H)-Leu- R_5

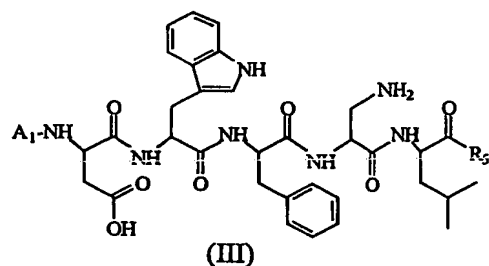


in cui A_1 e A_2 sono due gruppi protettivi dell'azoto diversi fra loro, e R_5 ed R_6 , diversi fra loro, sono scelti tra benzilossi e gruppi alchilossi inferiori, in cui la parte alchilica comprende un gruppo C_1 - C_4 lineare o ramificato;

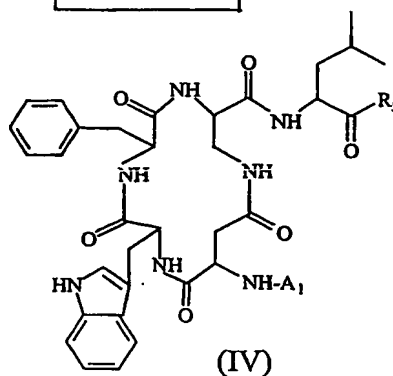
2) ciclizzazione intramolecolare del composto di formula (III) proveniente dallo stadio 1) in presenza di un solvente e di un opportuno agente accoppiante per dare il composto di formula (IV)



A_1 -Asp(OH)-Trp-Phe-Dpr(H)-Leu- R_5



A_1 -Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu- R_5

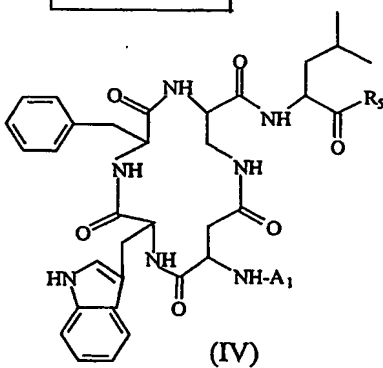


in cui R_5 è come sopra definito;

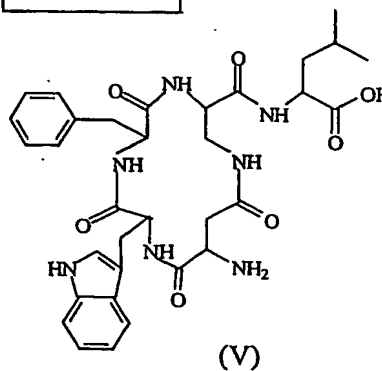
3) deprotezione del composto di formula (IV) proveniente dallo stadio 2)

in presenza di un solvente per dare il composto di formula (V)

A_1 -Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu- R_5



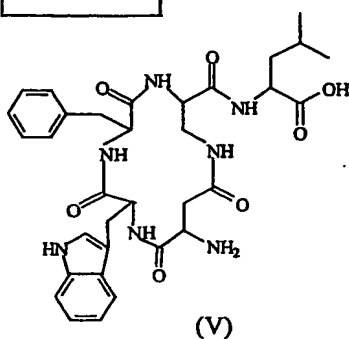
H-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-OH



in cui R_5 è come definito sopra;

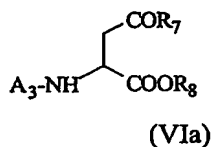
4) accoppiamento fra il composto di formula (V) proveniente dallo stadio 3) ed un aminoacido protetto di formula (VIa) in presenza di un solvente, per dare composti di formula (VII)

H-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-OH

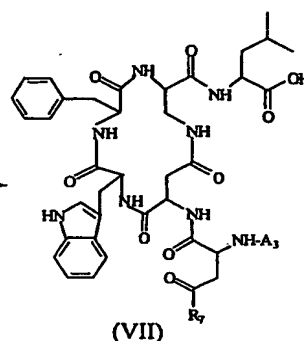


(V)

+



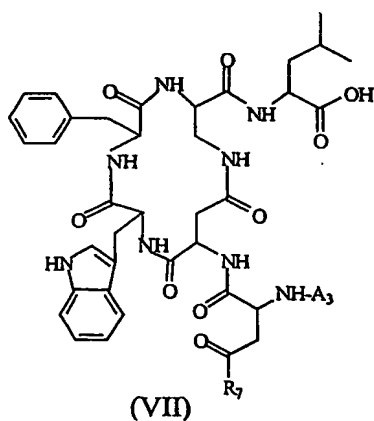
(VIa)

A₃-Asp(R₇)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-OH

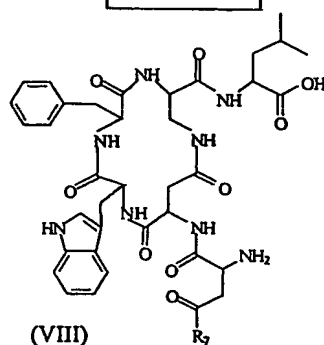
(VII)

in cui A₃ è un gruppo protettivo all'azoto; R₇ è scelto tra benzilossi e gruppi alchilossi inferiori, in cui la parte alchilica comprende un gruppo C₁-C₄ lineare o ramificato; R₈ è un gruppo residuo derivante da una procedura di attivazione del gruppo carbossilico;

5) deprotezione del composto di formula (VII) proveniente dallo stadio 4) in presenza di un solvente per dare il composto di formula (VIII)

A₃-Asp(R₇)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-OH

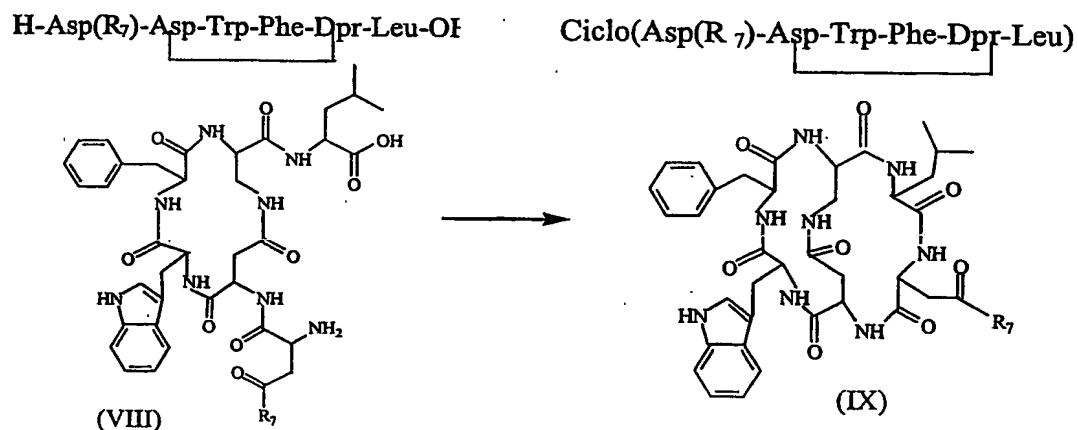
(VII)

H-Asp(R₇)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-OH

(VIII)

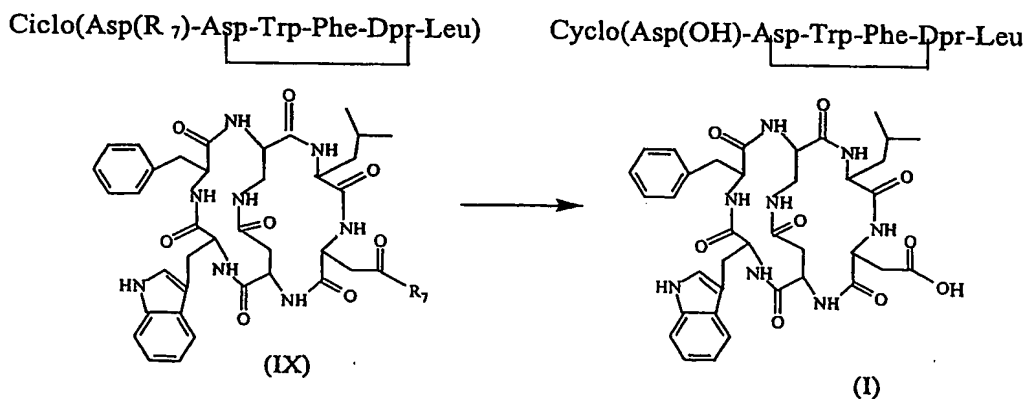
in cui R₇ è definito come sopra;

6) ciclizzazione intramolecolare, in presenza di un solvente e di un opportuno agente accoppiante, del composto di formula (VIII) proveniente dallo stadio 5) per dare il composto biciclico di formula (IX)



in cui R_7 è come definito sopra;

7) deprotezione del composto biciclico di formula (IX) proveniente dallo stadio 6) in presenza di un solvente, per ottenere il composto di formula (I)

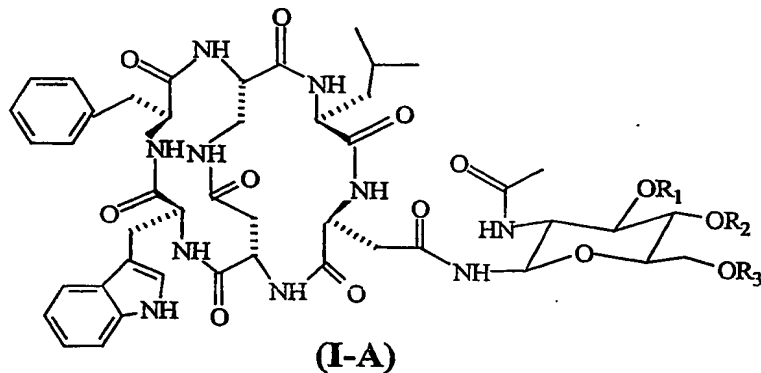


in cui R_7 è come definito sopra.

I composti di formula (I) possono essere impiegati ad esempio per la preparazione di composti glicopeptidici biciclici di formula (I-A) più avanti riportata, che possiedono una potente attività antagonista nei confronti

del recettore NK_2 di tachichinine; la Richiedente ha trovato un nuovo processo di preparazione, in cui un pendaglio glicosidico viene introdotto nei composti di formula (I) con una reazione condotta in soluzione, e la purificazione del prodotto finale tramite HPLC non è necessaria, così che si possono effettuare produzioni su larga scala di tali composti, a costi decisamente inferiori a quelli dell'attuale processo di produzione.

Rappresenta pertanto ulteriore oggetto della presente invenzione il processo per la preparazione di composti glicopeptidici biciclici di formula (I-A)

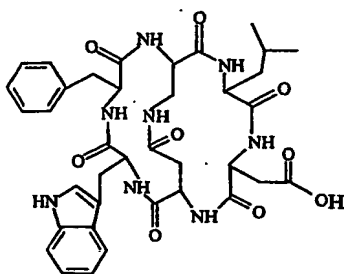


in cui R₁, R₂ e R₃, uguali o diversi fra loro, possono essere idrogeno o un gruppo protettivo all'ossigeno, comprendente i seguenti stadi:

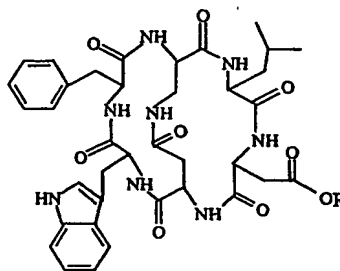
1A) attivazione di composti peptidici biciclici di formula (I) con un adatto agente accoppiante ad ottenere un derivato di formula (II-A)

Ciclo(Asp(OH)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu)

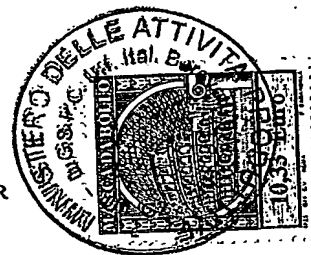
Ciclo(Asp(OR)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu)



(I)



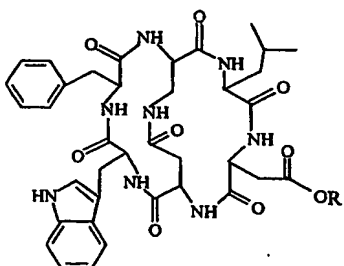
(II-A)



In cui R è un gruppo scelto fra benzotriazolo, eventualmente sostituito con alogeno, azabenzotriazolo e succinimidile;

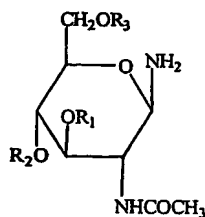
2A) reazione del composto di formula (II-A) proveniente dallo stadio 1A) in presenza di un solvente con un derivato glicosidico di formula (III-A)

Ciclo(Asp(OR)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu)

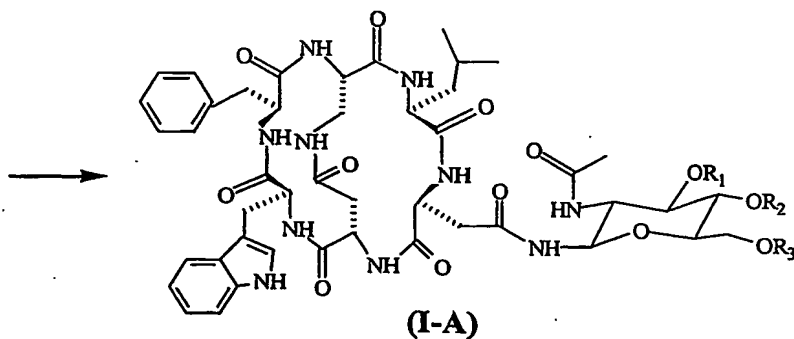


(II-A)

+



(III-A)



(I-A)

in cui R, R₁, R₂, R₃ sono come definiti sopra.

Ulteriore oggetto d'invensione è rappresentato dal processo per la preparazione del composto di formula (1-A) a partire dai composti di formula (II) e (III) passando attraverso la formazione del composto di formula (I) secondo i due processi sopra descritti.

I processi secondo l'invenzione, interamente condotti mediante reazioni in soluzione anziché in fase solida, mostrano rese inaspettatamente elevate e non richiedono l'utilizzo di processi purificativi tramite HPLC, consentendo perciò una significativa diminuzione dei costi di produzione e la possibilità di effettuare preparazioni su larga scala.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

I gruppi protettivi all'azoto impiegati nei presenti processi possono essere scelti fra uno qualsiasi dei gruppi protettivi utilizzabili nella sintesi peptidica come quelli riportati su M. Bodansky, *"Peptide Chemistry"*, Springer Verlag 1988 o su J. Jones, *"The Chemical Synthesis of Peptides"*, Clarendon Press. Oxford 1994.

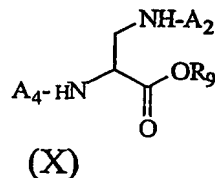
Secondo l'invenzione i gruppi protettivi all'azoto sono preferibilmente scelti nel gruppo costituito da benzilossicarbonile e alcossi carbonili in cui la parte alchilica comprende un gruppo C₁-C₄, lineare o ramificato; più preferibilmente sono scelti tra t-butossicarbonile (Boc) e benzilossicarbonile (Z).

R₈ è un gruppo residuo derivante da una procedura di attivazione, preferibilmente è scelto nel gruppo costituito da benzilossicarbonile, alchilossicarbonile comprendente nella parte alchilica un gruppo C₁-C₄

lineare o ramificato, succinimmidile, benzotriazolo eventualmente sostituito da alogeno e azabenzotriazolo.

I peptidi lineari di formula (II) possono essere preparati mediante una delle seguenti strategie:

a) Strategia stepwise: secondo questa strategia gli amminoacidi necessari ad ottenere il peptide di formula (II) vengono accoppiati sequenzialmente partendo da un derivato dell'amminoacido Dpr di formula (X), protetto all'azoto e preparato a parte o generato *in situ*

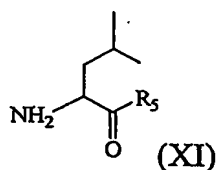


in cui:

A_2 ed A_4 , diversi tra loro, sono gruppi protettivi all'azoto, come sopra definiti;

R_9 è un gruppo residuo derivante da una procedura di attivazione, preferibilmente scelto nel gruppo costituito da benzilossicarbonile, alchilossicarbonile comprendente nella parte alchilica un gruppo C_1 - C_4 lineare o ramificato, e succinimmidile;

il derivato di formula (X) sopra riportata viene fatto reagire in presenza di un solvente con un estere della Leu (XI)



in cui R_5 è definito come sopra,

ottenendo il dipeptide A_4 -Dpr(A_2)-Leu- R_5 , che viene poi deproteetto con un metodo idoneo che è funzione del gruppo protettivo da rimuovere

presente sull'azoto, e compatibile con il gruppo protettivo da mantenere. Il dipeptide così deprotetto viene successivamente accoppiato con l'estere attivato dall'amminoacido Phe, e così via in sequenza con Trp e Asp fino ad ottenere i composti di formula (II).

b) Strategia 2+2+1: questa strategia prevede di accoppiare il dipeptide monodeprotetto H-Dpr(A₂)-Leu-R₅, ottenuto come descritto sopra secondo la strategia a), con un derivato attivato del dipeptide avente la seguente formula (XII)

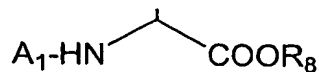


(XII)

in cui A₂ ed A₅, diversi tra loro, sono gruppi protettivi all'azoto, come sopra definiti;

preparato a parte o generato *in situ* tramite accoppiamento di un estere attivato di un Trp protetto all'azoto preparato a parte o generato *in situ*, con un estere della Phe e successiva idrolisi del gruppo estereo.

Il tetrapeptide risultante A₅-Trp-Phe-Dpr(A₂)-Leu-R₅ viene appropriatamente deprotetto dal gruppo legato all'azoto del Trp e accoppiato con un composto di formula (VI b)



(VI b)

in cui

A₁, R₆ ed R₈ sono definiti come sopra.

c) Strategia 3+2: secondo questa strategia il tripeptide A₁-Asp(R₆)-Trp-Phe-OH, ottenuto attraverso la rimozione del gruppo protettivo dell'azoto

dai composti di formula (XII) sopra riportata, e successivo accoppiamento con un composto di formula (VIb) sopra riportata, viene poi accoppiato con il dipeptide monodeprotetto H-Dpr-(A₂)-Leu-R₅ preparato come descritto secondo la procedura della strategia a).



Nell'ambito della presente invenzione, per gruppi alcossilici inferiori si intendono i gruppi alcossilici in cui la parte alchilica comprende un gruppo C1-C4, lineare o ramificato, preferibilmente scelto fra metile, etile, propile, butile, isopropile e t-butile. Parimenti vale per i gruppi alchilossicarbonilici dell'invenzione, in cui la parte alchilica comprende un gruppo C1-C4 lineare o ramificato, preferibilmente scelto fra metile, etile, propile, butile, isopropile e t-butile.

L'agente accoppiante può essere scelto fra uno qualsiasi di quelli più comunemente usati nella sintesi peptidica, in modo da generare un derivato attivato di un amminoacido come quelli riportati ad esempio in M. Bodansky, "*Peptide Chemistry*", Springer Verlag 1988 o in J. Jones, "*The Chemical Synthesis of Peptides*", Clarendon Press. Oxford 1994.

La preparazione dei derivati attivati, se non commercialmente disponibili, può avvenire separatamente o *in situ* grazie alla reazione tra un amminoacido o un peptide e uno o più dei numerosi agenti accoppianti noti, come ad esempio l'isobutilcloroformiato (IBCF), una carbodiimmide scelta tra dicioesilcarbodiimmide (DCC) e 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide cloridrato (EDAC.HCl) eventualmente in combinazione con un idrossiderivato scelto tra 1-idrossibenzotriazolo (HOBt), 1-idrossi-7-azabenzotriazolo (HOAt), 6-cloro-1-idrossibenzotriazolo (Cl-HOBt) e idrossisuccinimide (HOSu); un

sale di fosfonio, di guanidinio N-ossido o di uronio, come ad esempio (Benzotriazol-1-ilossi)tris(dimetilammino)fosfonio esafluorofosfato (BOP), (Benzotriazol-1-ilossi)tripirrolidino fosfonio esafluorofosfato (PyBOP), 1-[bis(dimetilammino)metilene]-1H-benzotriazolio-3-ossido esafluorofosfato (HBTU), 1-[bis(dimetilammino)metilene]-5-cloro-1H-benzotriazolio-3-ossido esafluorofosfato (HCTU), 1-[bis(dimetilammino)metilene]-1H-benzotriazolio-3-ossido tetrafluoroborato (TBTU), 1-[bis(dimetilammino)metilene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio-3-ossido esafluorofosfato (HATU), 1-[bis(dimetilammino)metilene]-5-cloro-1H-benzotriazolio-3-ossido tetrafluoroborato (TCTU), O-[(etossicarbonil)cianometilenammino]-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TOTU), O-(biciclo[2.2.1]ept-5-ene-2,3-dicarbossilimmido)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TNTU), o O-(N-succinimmidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TSTU).

Nel caso in cui il derivato venga generato *in situ* la reazione di accoppiamento è condotta immediatamente dopo per aggiunta dell'altro reagente, che ovviamente, nel caso delle ciclizzazioni intramolecolari, corrisponde all'estremità amminica libera presente nella molecola stessa.

La reazione di accoppiamento è usualmente condotta in presenza di un'ammina terziaria come ad esempio N-metilmorfolina (NMM), trietilammina (TEA) o diisopropiletilammina (DIPEA) in un solvente organico scelto tra quelli generalmente utilizzati nella sintesi peptidica. I solventi preferiti per le reazioni di accoppiamento sono etil acetato (AcOEt), dimetilformammide (DMF) e N-metilpirrolidone (NMP).

Le reazioni di accoppiamento possono essere effettuate ad una temperatura tale da non provocare degradazioni o da rendere troppo lenta la reazione stessa; la temperatura è preferibilmente compresa tra -20 e $+50^{\circ}\text{C}$.

Le deprotezioni nei processi secondo l'invenzione sono eseguite mediante i metodi appropriati per i gruppi da rimuovere e compatibili con i gruppi da mantenere; generalmente le presenti reazioni di deprotezione sono condotte mediante idrogenazione catalitica o trattamenti acidi o basici.

Nel caso delle idrogenazioni il catalizzatore può essere scelto fra la varietà dei catalizzatori adatti allo scopo e disponibili; Palladio al 5% o 10% sono i preferiti. Il solvente per le reazioni di deprotezione per idrogenazione catalitica può essere scelto fra quelli che sciolgono i composti in reazione escludendo chetoni come l'acetone, i solventi che avvelenano il catalizzatore e quelli che reagiscono con i componenti stessi della reazione. DMF, NMP, acidi organici come l'acido acetico e l'acido p-toluensolfonico (PTSA), e alcoli come metanolo, etanolo e isopropanolo, o loro miscele, sono i solventi di reazione preferiti. La temperatura della reazione di idrogenazione è compresa tra -20 e $+50^{\circ}\text{C}$.

Nel caso delle deprotezioni mediante trattamento acido, sono preferibilmente utilizzati acidi minerali, come l'acido cloridrico, o acidi organici, come l'acido trifluoroacetico o l'acido formico, che possono essere usati puri o in miscela con altri solventi. La temperatura è compresa tra -20 e $+50^{\circ}\text{C}$.

Nel caso delle deprotezioni mediante trattamento basico, sono preferibilmente utilizzati idrossidi di metalli alcalini e alcalino terrosi in presenza di un solvente come acqua, diossano, acetonitrile, metanolo, etanolo, isopropanolo o loro miscele; la temperatura è compresa tra -20 e $+50^{\circ}\text{C}$.

Per gruppo protettivo all'ossigeno secondo l'invenzione si intende un gruppo protettivo tra quelli comunemente impiegati per la protezione dei gruppi $-\text{OH}$ e ben noti agli esperti del ramo, scelti ad esempio nel gruppo costituito da $-\text{COR}_4$ dove R_4 è un gruppo alchile, lineare o ramificato, con da 1 a 4 atomi di carbonio, fenile eventualmente sostituito con un atomo di alogeno, benzile e benzoile; preferibilmente il gruppo protettivo all'ossigeno è acetile.

Secondo l'invenzione i composti glicopeptidici di formula (I-A) possono essere ottenuti per reazione di un derivato glicosidico di formula (III-A) con un derivato peptidico attivato di formula (II-A), ottenuto tramite una reazione di attivazione o generato *in situ* da un composto di formula (I).

Quindi, nel processo di preparazione dei composti glicopeptidici biciclici di formula (1-A), il gruppo glicosidico viene introdotto non a livello del peptide lineare, ma sul composto peptidico biciclico.

Nel caso in cui vengano fatti reagire composti di formula (III-A) in cui R_1 , R_2 e R_3 non sono idrogeno, i composti di formula (I-A) ottenuti possono essere trasformati nei corrispondenti composti in cui $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{H}$ mediante idrogenazione catalitica, o con un trattamento acido o basico a seconda della natura dei gruppi protettivi R_1 , R_2 e R_3 presenti.

I composti glicosidici di formula (III-A) preferibilmente impiegati nel processo secondo l'invenzione sono scelti nel gruppo costituito da 2-acetammido-2-desossi- β -D-glucopiranosilammina e 2-acetammido-3,4,6-tri-O-acetil-2-desossi- β -D-glucopiranosilammina, che sono noti in letteratura e possono essere ad esempio preparati come rispettivamente descritto su I. Shin et al., *Tetrahedron Letters*, 42 (2001) 1325-1328 e su D. Macmillan et al., *Organic Letters*, Vol. 4, N° 9, 2002.



I seguenti esempi e schemi di sintesi illustrano ulteriormente l'invenzione senza peraltro limitarla.

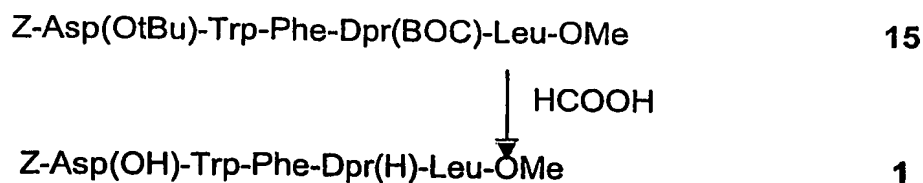
Mentre lo schema 1 indica la via di sintesi che, partendo dai composti di formula (II), conduce a quelli di formula (I-A), gli schemi 2-4 mostrano le tre diverse strategie per preparare i composti di formula (II).

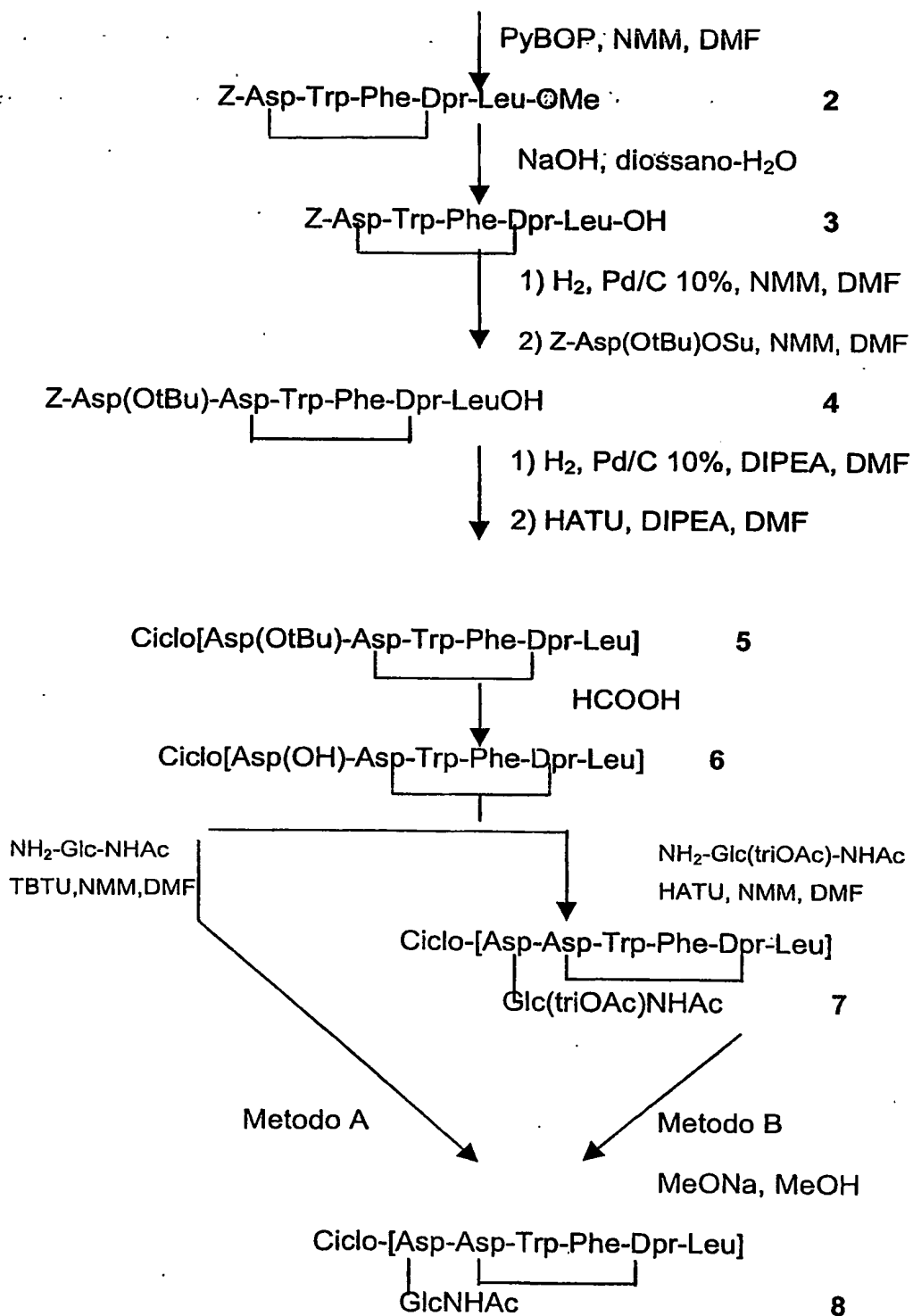
I gruppi protettivi indicati come esempio sono il t-butossicarbonile (BOC) e il benzilossicarbonile (Z) per le estremità amminiche, e il metilestere e t-butilestere per le estremità carbossiliche.

I numeri riportati accanto a ciascun composto negli schemi seguenti corrispondono ai numeri attribuiti ai composti negli Esempi.

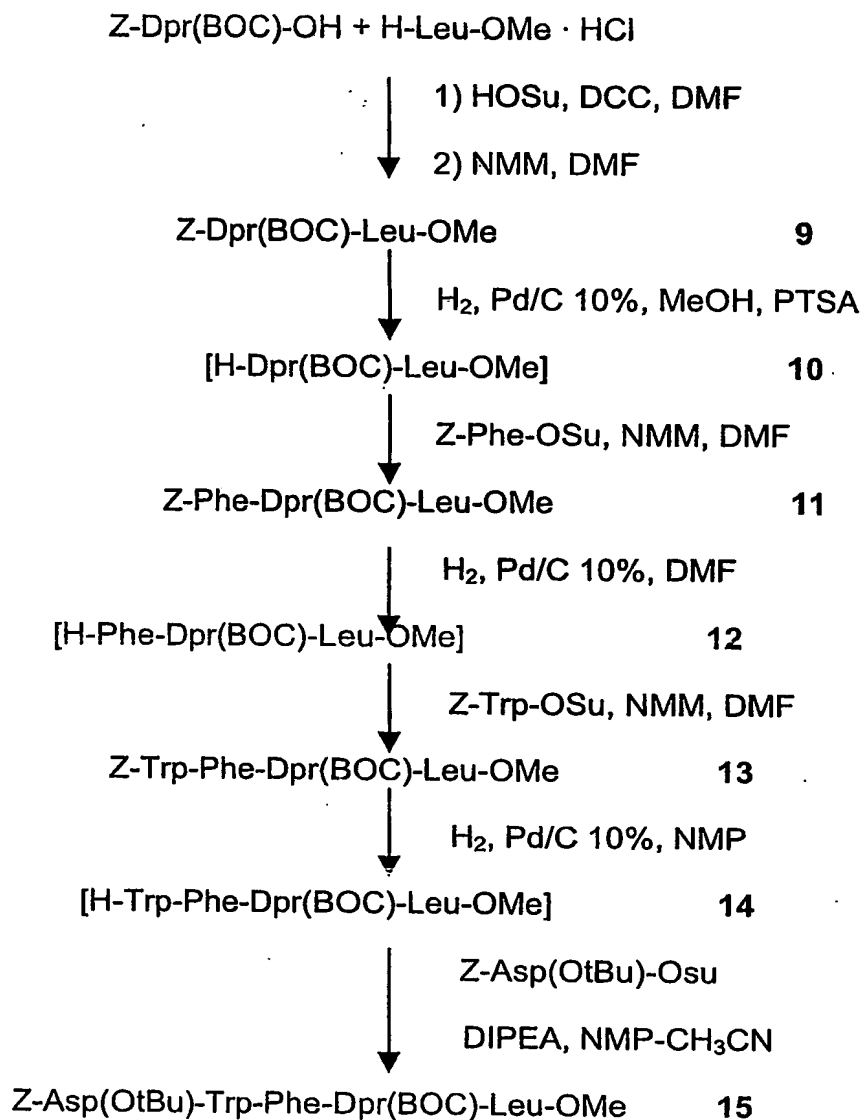
L'identificazione e la valutazione della purezza dei vari composti preparati è stata stabilita mediante analisi elementare, HPLC, $^1\text{H-NMR}$, IR e massa.

Schema 1: sintesi dei composti di formula (I-A)



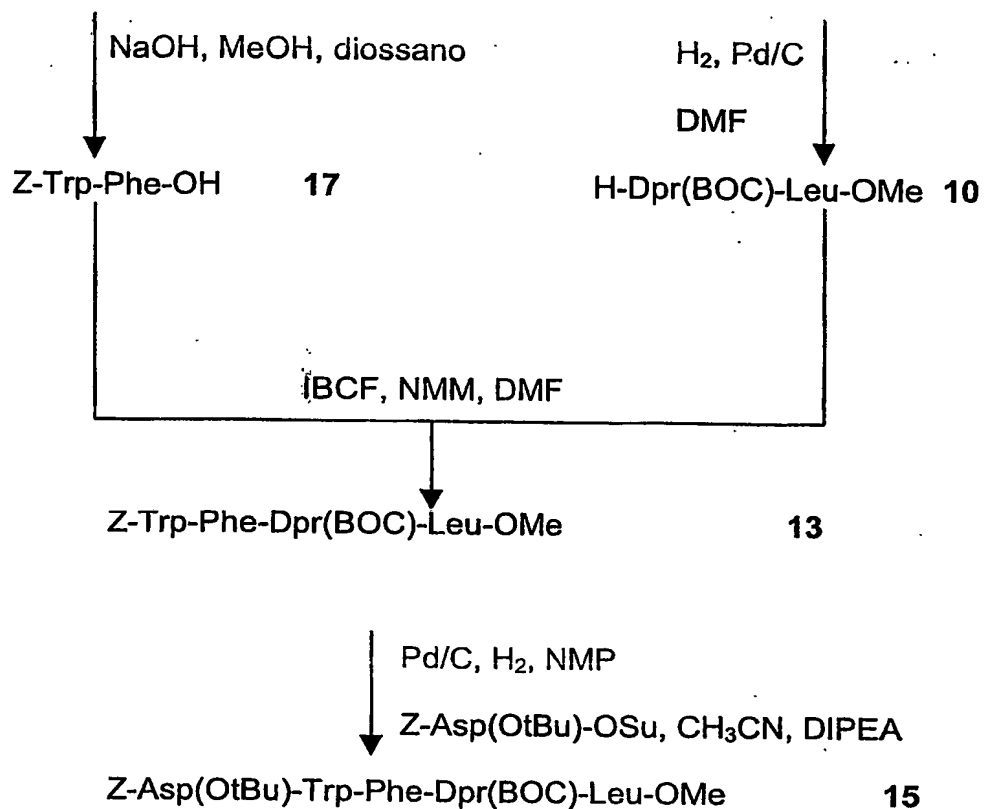


Schema 2: sintesi dei composti di formula (II) secondo la strategia a)
(strategia stepwise)

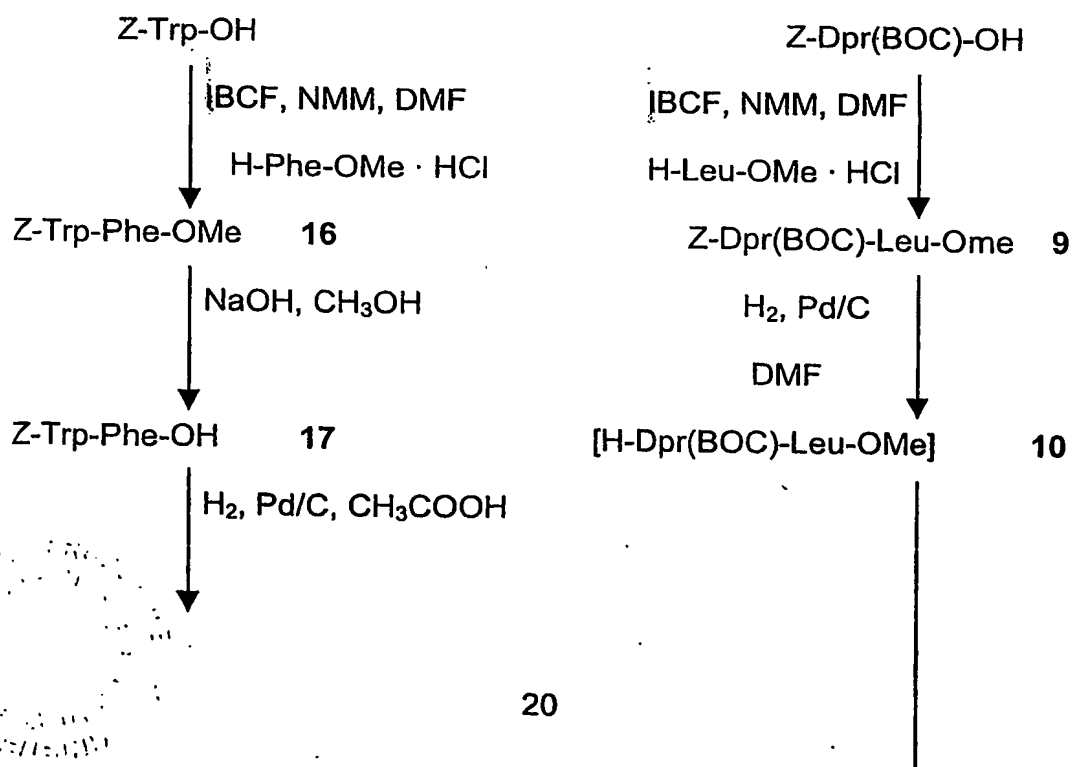


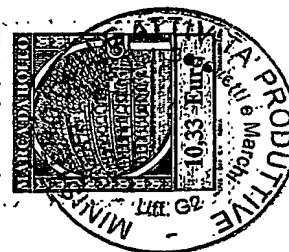
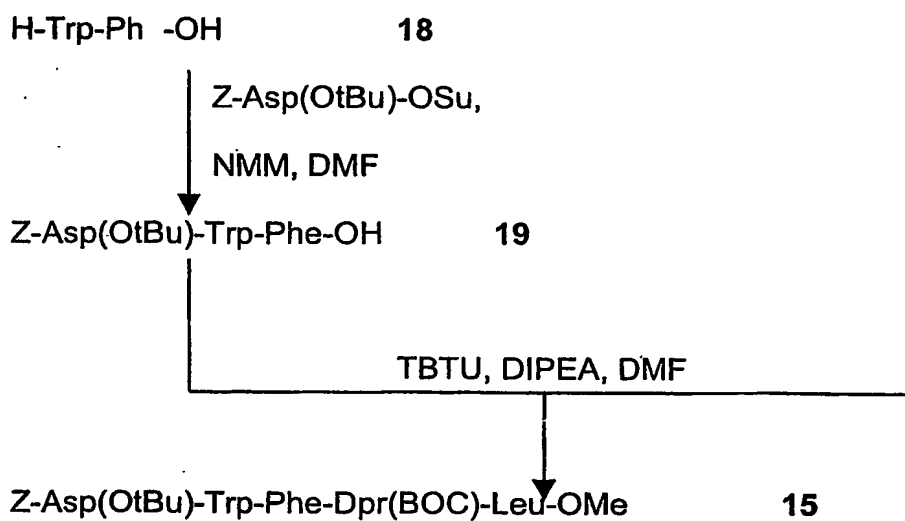
Schema 3: sintesi dei composti di formula (II) secondo la strategia b)
(strategia 2 + 2+1)





Schema 4: sintesi dei composti di formula (II) secondo la strategia c)
(strategia 3 + 2)





ESEMPIO 1

Preparazione di Z-Asp(OH)-Trp-Phe-Dpr(H)-Leu-OMe

Una soluzione 72 mmoli/l di Z-Asp(OtBu)-Trp-Phe-Dpr(BOC)-Leu-OMe, preparato come descritto nell'Esempio 15, in acido formico al 95% viene scaldato a 40°C, sottovuoto, per 4 ore.

La miscela di reazione viene evaporata a pressione ridotta e il residuo viene ripreso con una miscela 8:2 CH₃CN-H₂O.

Si raffredda la sospensione a 15-20°C e si corregge il pH a 6 aggiungendo una soluzione acquosa al 20% di NMM.

L'acetonitrile viene evaporato a pressione ridotta e la risultante sospensione viene filtrata.

Il solido biancastro ottenuto viene lavato con H₂O e seccato sottovuoto a 30-40°C fornendo una resa pari al 96,4%.

¹H-NMR dimetilsolfossido-d₆ (DMSO-d₆) δ:

0,86 (2d; 6H); 1,47-1,75 (m; 3H); 2,32-2,68 (m; 2H); 2,79-3,55 (m; 6H); 3,63 (s; 3H); 4,25-4,65 (m; 5H); 4,99 (AB-Syst.; 2H); 6,91-7,43 (m; 14H); 7,48-7,60 (2d; 2H); 7,82 (b; 2H); 8,03-8,43 (4d; 4H); 10,83 (s; 1H); 12,35 (b; 1H).

ESEMPIO 2

Preparazione di Z-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-Ome



A una soluzione 24 mmoli/l di Z-Asp(OH)-Trp-Phe-Dpr(NH₂)-Leu-OMe in DMF si aggiungono 2,2 equivalenti di NMM e dopo 5-10 minuti 1,2 equivalenti di PyBOP.

Dopo 2-3 ore di agitazione a temperatura ambiente la soluzione viene evaporata a pressione ridotta fino a ottenere un residuo fluido che viene gocciolato in una soluzione acquosa 0,5 M di NaHCO_3 .

La risultante sospensione viene filtrata e il solido ottenuto viene lavato con miscela 4:6 DMF - H_2O e poi H_2O fino a pH neutro e seccato sottovuoto a 30-50 °C, fornendo una resa pari al 84,2 %.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ :

0,83 (2d; 6H); 1,34-1,69 (m; 3H); 2,31-2,92 (m; 4H); 3,03-3,91 (m; 4H); 3,61 (s; 3H); 4,17-4,63 (m; 5H); 5,01 (AB-Syst.; 2H); 6,84-7,48 (m; 16H); 7,60 (d; 1H); 7,87 (d; 2H); 8,01 (t; 1H); 8,27 (d; 1H); 10,81 (s; 1H).

ESEMPIO 3

Preparazione di Z-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-OH

Una soluzione torbida contenente 77 mmoli/l di Z-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-OMe in una miscela diossano - H_2O 8 : 2 viene scaldata a 35 °C e mantenuta a pH 12,0 - 12,5 per aggiunta lenta e continua di NaOH 1,5 N.

A fine reazione la soluzione torbida viene portata a pH 9 per aggiunta di HCl 6N, chiarificata per filtrazione su un letto di coadiuvante di filtrazione e acidificata a pH 3 sempre per aggiunta di HCl 6N.

La soluzione viene concentrata a pressione ridotta fino a ottenere una sospensione filtrabile.

Il solido biancastro filtrato viene lavato con miscela diossano- H_2O 1:1 e poi con H_2O e seccato sottovuoto a 30-40°C, fornendo una resa pari al 97,7%.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ :

0,84 (2d; 6H); 1,42-1,76 (m; 3H); 2,29-3,48 (m; 7H); 3,85 (m; 1H); 4,10-4,65 (m; 5H); 5,00 (AB-Syst.; 2H); 6,86-7,47 (m; 16H); 7,55-8,36 (4d+m; 5H); 10,80 (d; 1H); 12,65 (b; 1H).

ESEMPIO 4

Preparazione di Z-Asp(OtBu)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-OH

Una soluzione 66 mmoli/l di Z-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-OH in DMF viene

idrogenata a temperatura ambiente, in presenza di 1 equivalente di NMM e di quantità catalitiche di Pd/C al 10%, umido al 50%.

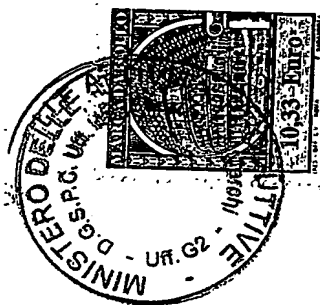
Dopo 6 ore di reazione si filtra la sospensione per rimuovere il catalizzatore e si diluisce il filtrato con DMF fino a ottenere una soluzione 53 mmoli/l di H-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-OH, a cui si aggiungono 4

equivalenti di NMM e 1,05 equivalenti di Z-Asp(OtBu)OSu.

Dopo 5 ore di agitazione a temperatura ambiente la miscela viene evaporata a pressione ridotta fino a ottenere un residuo che viene gocciolato in H_2SO_4 0,05 N.

La risultante sospensione viene filtrata e il solido ottenuto viene lavato con una miscela di DMF- H_2O 1:1 e poi con H_2O e seccato sottovuoto a 30-40°C, fornendo una resa pari al 93,7%.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ :



0,84 (2d; 6H); 1,35 (s; 9H); 1,40-1,70 (m; 3H); 2,20-3,94 (m; 10H); 4,10-4,81 (m; 6H); 4,92-5,12 (AB-Syst.; 2H); 6,74-7,57 (m; 17H); 7,71-8,35 (4d+1t; 5H); 10,70 (s; 1H); 12,70 (b; 1H).

ESEMPIO 5

Preparazione di Ciclo[Asp(OtBu)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu]

Una soluzione 47 mmoli/l di Z-Asp(OtBu)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-OH

in DMF viene idrogenata a temperatura ambiente, in presenza di 1 equivalente di DIPEA e di quantità catalitiche di Pd/C al 10%, umido al 50%.

Dopo circa 2 ore di reazione si filtra la sospensione per rimuovere il catalizzatore e si diluisce con DMF fino ad ottenere una soluzione 19 mmoli/l di H-Asp(OtBu)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-OH, a cui si

aggiungono 1,4 equivalenti di DIPEA e 1,2 equivalenti di HATU.

Dopo 30-60 minuti di agitazione a temperatura ambiente la soluzione viene evaporata a pressione ridotta fino ad ottenere un residuo che viene gocciolato in una soluzione acquosa 0,5 M di NaHCO₃.

La risultante sospensione viene filtrata e il solido ottenuto viene lavato con abbondante H₂O fino a pH neutro e seccato sottovuoto a 30-50°C, fornendo una resa pari al 94,1%.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ:

0,88 (2d; 6H); 1,38 (s; 9H); 1,31-1,72 (m; 3H); 2,33-2,99 (m; 6H); 3,20-3,63 (m; 3H); 3,87-4,62 (m; 7H); 6,75-7,50 (m; 13H); 8,04 (b; 1H); 8,56 (d; 1H); 8,76 (d; 1H); 9,18 (b; 1H); 10,84 (s; 1H).

ESEMPIO 6

Preparazione di Ciclo[Asp(OH)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu]

Una soluzione 83 mmoli/l di ciclo[Asp(OtBu)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu] in

acido formico al 90% viene scaldata a 40°C, sottovuoto, per 2 ore.

La miscela di reazione viene evaporata a pressione ridotta fino a ottenere un residuo denso che viene ripreso con H₂O.

La risultante sospensione viene filtrata e il solido ottenuto viene lavato con H₂O, seccato sottovuoto a 30-40°C e infine purificato, mediante una colonna di Sephadex® LH-20, eluendo con metanolo.

Si ottengono 314 g di solido bianco (titolo 95,2%, resa 82,0%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ:

0,88 (2d; 6H); 1,31-1,77 (m; 3H); 2,32-3,73 (m; 9H); 3,80-4,65 (m; 7H); 6,82-7,51 (m; 13H); 7,94-9,19 (2d; 2b; 4H); 10,85 (s; 1H); 12,20 (s; 1H).

ESEMPIO 7

Preparazione di Ciclo[Asp-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu]

Glc(triOAc)NHAc

A una soluzione 0,24 moli/l di ciclo[Asp(OH)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu] in

DMF si aggiungono, a distanza di 10 minuti uno dall'altro, 3 equivalenti di NMM, 1,2 equivalenti di HATU e di 2-acetammido-3,4,6-tri-O-acetil-2-desossi- β -D-glucopiranosilammina.

Dopo 1 ora di agitazione a 0-4°C la miscela di reazione viene evaporata a pressione ridotta fino a ottenere un residuo fluido che viene gocciolato in una soluzione acquosa all'1% di NaHCO₃.

La risultante sospensione viene filtrata e il solido ottenuto viene lavato con H₂O, seccato sottovuoto a 30-40°C e purificato per cristallizzazione da una miscela EtOH-H₂O.

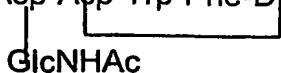
Si ottengono 117 g di solido bianco (titolo 96,0%, resa 87,0%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ :

10,80 (d; 1H); 8,90 (b; 1H); 8,72 (d; 1H); 8,47 (d; 1H); 8,46 (d; 1H); 8,08 (b; 1H); 7,84 (d; 1H); 7,43 (dd; 1H); 7,33 (dd; 1H); 7,24 (b; 1H); 7,23 (m; 2H); 7,16 (m; 3H); 7,14 (d; 1H); 7,06 (dt; 1H); 7,00 (d; 1H); 6,98 (dt; 1H); 6,90 (t; 1H); 5,18 (dd; 1H); 5,12 (dd; 1H); 4,82 (dd; 1H); 4,18 (dd; 1H); 3,96 (dd; 1H); 3,85 (ddd; 1H); 3,80 (ddd; 1H); 4,53 (m; 1H); 4,47 (m; 1H); 4,43 (m; 1H); 4,39 (m; 1H); 4,16 (m; 1H); 4,08 (m; 1H); 3,58 (m; 1H); 3,30 (m; 1H); 2,98 (m; 1H); 2,88 (m; 1H); 2,86 (m; 1H); 2,70 (m; 1H); 2,65 (m; 1H); 2,60 (m; 1H); 2,19 (m; 1H); 2,00 (s; 3H); 1,96 (s; 3H); 1,90 (s; 3H); 1,73 (s; 3H); 1,65 (m; 1H); 1,52 (m; 1H); 1,37 (m; 1H); 0,92 (d; 3H); 0,85 (d; 3H).

ESEMPIO 8

Preparazione di Ciclo[Asp-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu] (Nepadutant)



Metodo a)

A una soluzione 83 mmoli/l di ciclo[Asp(OH)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu]

(preparato come descritto nell'Esempio 6) in DMF si aggiungono, a distanza di 10 minuti uno dall'altro, 2 equivalenti di NMM e 1,3 equivalenti di TBTU e di 2-acetammido-2-desossi- β -D-glucopiranosilammina.

Dopo 1 ora di agitazione a temperatura ambiente la miscela di reazione viene evaporata a pressione ridotta fino a ottenere un residuo oleoso denso che viene ripreso con una miscela 2:8 acetonitrile-t-buttosimetano (TBME). La sospensione risultante viene vigorosamente agitata per 30 minuti a temperatura ambiente e poi filtrata.

Il solido ottenuto viene lavato con TBME, seccato sottovuoto a 25-30°C e infine purificato tramite HPLC preparativo utilizzando miscele eluenti composte da acetonitrile e acqua.

Si ottengono 151 g di solido bianco (titolo 93,0%, resa 89,3%).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ :

0,85 (d; 3H); 0,92 (d; 3H); 1,36 (m; 1H); 1,51 (m; 1H); 1,65 (m; 1H); 1,76 (s; 3H); 2,16 (dd; 1H); 2,57 (dd; 1H); 2,63 (dd; 1H); 2,67 (dd; 1H); 2,83 (dd; 1H); 2,88 (dd; 1H); 2,93 (m; 1H); 3,04-3,09 (m; 2H); 3,27-3,32 (m; 2H); 3,42 (m; 1H); 3,50 (ddd + b; 2H); 3,65 (dd; 1H); 3,96 (b; 1H); 4,09 (m; 1H); 4,12 (m; 1H); 4,35 (m; 1H); 4,43 (m; 1H); 4,50 (m; 1H); 4,53 (m + t; 2H); 4,81 (dd; 1H); 4,94 (d; 1H); 4,98 (d; 1H); 6,91 (b; 1H); 6,98 (t + b; 2H); 7,06 (t; 1H); 7,14-7,17



(m; 4H); 7,24 (t; 2H); 7,27 (b; 1H); 7,33 (d; 1H); 7,42 (d; 1H); 7,77 (d; 1H); 8,05 (b; 1H); 8,10 (d; 1H); 8,51 (d; 1H); 8,77 (d; 1H); 9,00 (b; 1H); 10,84 (d; 1H).

Metodo b)

A una soluzione 0,89 moli/l di ciclo[Asp-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu]
 $\text{Glc}(\text{triOAc})\text{NHAc}$

preparato come descritto nell'Esempio 7 in MeOH si aggiungono 0,04 equivalenti di NaOMe 0,1 N in MeOH.

Dopo 3 ore di agitazione a temperatura ambiente si corregge il pH a 6,5-7 aggiungendo Amberlyst® 15. Dopo allontanamento della resina, la soluzione viene concentrata a pressione ridotta fino a ottenere un residuo che viene diluito con TBME.

La risultante sospensione viene filtrata e il solido bianco ottenuto viene lavato con TBME e seccato sottovuoto a 35-40°C, fornendo una resa pari al 94,8%.

ESEMPIO 9

Preparazione di Z-Dpr(BOC)-Leu-OMe

Metodo a)

A una soluzione 0,66 moli/l di Z-Dpr(BOC)-OH in DMF vengono aggiunti 1,2 equivalenti di NMM. Si raffredda la soluzione a -25°C e si gocciola 1 equivalente di IBCF mantenendo sempre la temperatura inferiore a -20°C.

Dopo circa 10 minuti si gocciola una soluzione preraffreddata 0,78 moli/l in DMF contenente 1 equivalente di H-Leu-OMe HCl e di NMM, mantenendo la temperatura sempre inferiore a -15°C .

Dopo 1 ora di agitazione la miscela di reazione viene gocciolata in una soluzione acquosa 0,5 M di NaHCO_3 .

La sospensione risultante viene filtrata e il solido ottenuto viene lavato in sequenza con H_2O , H_2SO_4 0,05 M e H_2O fino a pH neutro e seccato sottovuoto a $30-50^{\circ}\text{C}$, fornendo una resa pari al 89,0%.

p.f. $122-125^{\circ}\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ :

0,85 (2d; 6H); 1,37 (s; 9H); 1,40-1,71 (m; 3H); 3,01-3,36 (m; 2H); 3,61 (s; 3H); 4,06-4,37 (m; 2H); 5,03 (s; 2H); 7,35 (s; 5H); 6,66 (t; 1H); 7,20 (d; 1H); 8,29 (d; 1H).

Metodo b)

Ad una soluzione 0,35 moli/l di Z-Dpr(BOC)-OH in DMF contenente 1 equivalente di HOSu si aggiunge, raffreddando a $0-5^{\circ}\text{C}$, 1 equivalente di DCC. La miscela viene portata a temperatura ambiente e agitata per 1 ora. La DCC viene rimossa per filtrazione e al filtrato limpido vengono aggiunti 1,2 equivalenti di H-Leu-OMe HCl e 2,6 equivalenti di NMM. Dopo 2-3 ore di agitazione a temperatura ambiente la miscela viene diluita con NaHCO_3 0,5 N raffreddando a -5°C .

La risultante sospensione viene filtrata e il solido ottenuto viene lavato in sequenza con NaHCO_3 0,5 N, miscela $\text{H}_2\text{O-DMF}$ 2:1 e H_2O e seccato sottovuoto a $30-40^{\circ}\text{C}$, fornendo una resa pari al 93%.

ESEMPIO 10

Preparazione di H-Dpr(BOC)-Leu-OMe

Una soluzione 0,14 mol/l di Z-Dpr(BOC)-Leu-OMe in MeOH contenente 1 equivalente di PTSA viene idrogenata a temperatura ambiente in presenza di quantità catalitiche di Pd/C al 10% umido al 50%.

Dopo circa 2 ore di reazione si filtra la sospensione per rimuovere il catalizzatore e si diluisce il filtrato con DMF.

Si evapora completamente a pressione ridotta il MeOH e l'H₂O e si utilizza la soluzione di DMF residua contenente il dipeptide per il successivo accoppiamento.

ESEMPIO 11

Preparazione di Z-Phe-Dpr(BOC)-Leu-OMe

Il composto è stato preparato a partire dal dipeptide H-Dpr(BOC)-Leu-OMe dell'Esempio 10, secondo le metodiche descritte nell'Esempio 9 utilizzando Z-Phe-OH.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ:

0,86 (2d; 6H); 1,38 (s; 9H); 1,40-1,74 (m; 3H); 2,73-3,02 (m; 2H); 3,10-3,41 (m; 2H); 3,62 (s; 3H); 4,17-4,46 (m; 3H); 4,94 (AB-Syst.; 2H); 7,18-7,39 (m; 10H); 6,52 (t; 1H); 7,52 (d; 1H); 8,13 (d; 1H); 8,25 (d; 1H).

ESEMPIO 12

Preparazione di H-Phe-Dpr(BOC)-Leu-OMe

Il composto è stato ottenuto dal derivato protetto dell'Esempio 11, secondo la metodica dell'Esempio 10, utilizzando DMF come solvente.

ESEMPIO 13

Preparazione di Z-Trp-Phe-Dpr(BOC)-Leu-OMe

Il composto è stato preparato secondo le metodiche dell'Esempio 9 partendo dal tripeptide dell'Esempio 12 e impiegando Z-Trp-OH o

accoppiando i due dipeptidi Z-Trp-Phe-OH e H-Dpr(BOC)-Leu-OMe ottenuti rispettivamente come descritto negli esempi 17 e 10.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ :

0,86 (2d; 6H); 1,37 (s; 9H); 1,40-1,76 (m; 3H); 2,73-3,41 (m; 6H); 3,62 (s; 3H); 4,16-4,67 (m; 4H); 4,93 (AB-Syst.; 2H); 6,89-7,65 (m; 16H); 6,55 (t; 1H); 8,07 (d; 1H); 8,11 (d; 1H); 8,29 (d; 1H); 10,79 (s; 1H).

ESEMPIO 14

Preparazione di H-Trp-Phe-Dpr(BOC)-Leu-OMe

Il composto è stato ottenuto dal derivato protetto dell'Esempio 13, secondo la metodica dell'Esempio 10, utilizzando NMP come solvente.

ESEMPIO 15

Preparazione di Z-Asp(OtBu)-Trp-Phe-Dpr(BOC)-Leu-OMe

Metodo a)

Alla soluzione 0,16 moli/l di H-Trp-Phe-Dpr(BOC)-Leu-OMe in NMP, proveniente dalla reazione di idrogenazione, si aggiungono 1 volume di CH_3CN , 1,5 equivalenti di DIPEA e 1,15 equivalenti di Z-Asp(OtBu)-OSu. Dopo 3-4 ore di agitazione a temperatura ambiente si raffredda la miscela di reazione a 5°C e si diluisce con H_2O .

La risultante sospensione viene filtrata e il solido ottenuto viene lavato con miscela 3:7 $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ e con H_2O e poi seccato sottovuoto a $30-50^\circ\text{C}$, fornendo una resa pari al 90%.

Metodo b)

A una soluzione 0,22 moli/l di Z-Asp-(OtBu)-Trp-Phe-OH in DMF, raffreddata a -5°C si aggiungono 1 equivalente di DIPEA, 1,1 equivalente di TBTU e dopo 5 minuti 1 equivalente della soluzione 0,25



mol/l di H-Dpr(BOC)-Leu-OMe in DMF proveniente dalla reazione di idrogenazione (Esempio 10), mantenendo la temperatura inferiore a -5°C.

Dopo circa 2 ore di agitazione la miscela di reazione è diluita con una soluzione acquosa 0,5 M di NaHCO₃.

La risultante sospensione viene filtrata e il solido ottenuto viene lavato in sequenza con H₂O, miscela 3:4 DMF-NaHCO₃ 0,5 M in H₂O e H₂O e poi seccato sottovuoto a 30-40°C, fornendo una resa pari al 84,4%.

p.f. 215-218°C; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ:

0,86 (2d; 6H); 1,34 (s; 9H); 1,37 (s; 9H), 1,40-1,72 (m; 3H); 2,23-2,67 (m; 2H); 2,71-3,39 (m; 6H); 3,62 (s; 3H); 4,23-4,58 (m; 5H); 5,01 (AB-Syst., 2H); 6,89-7,58 (m; 16H); 6,50 (t; 1H); 7,87-8,29 (4d; 4H); 10,78 (s; 1H).

ESEMPIO 16

Preparazione di Z-Trp-Phe-OMe

Il composto è stato preparato secondo le metodiche dell'Esempio 9 accoppiando i due amminoacidi Z-Trp-OH e H-Phe-OMe.

¹H-NMR (CDCl₃) δ:

2,88-2,98 (m; 2H); 3,11 (dd; 1H); 3,32 (dd; 1H); 3,62 (s; 3H); 4,40-4,58 (m; 1H); 4,16-4,30 (m; 1H); 5,11 (s; 2H); 5,45 (d; 1H), 6,11 (d; 1H); 6,72-6,85 (m; 2H), 6,92-7,46 (m; 12H); 7,67 (d; 1H); 8,03 (s; 1H).

ESEMPIO 17

Preparazione di Z-Trp-Phe-OH

Il composto è stato preparato dal metilestere dell'Esempio 16, secondo la metodica descritta nell'Esempio 3.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ:

2,70-3,15 (m; 4H); 4,20-4,36 (m; 1H); 4,38-4,55 (m; 1H); 4,92 (s; 2H); 6,85-7,42 (m; 15H); 7,63 (d; 1H); 8,26 (d; 1H); 10,81 (s; 1H); 12,30 (b; 1H).

ESEMPIO 18

Preparazione di H-Trp-Phe-OH

Il composto è stato preparato dal derivato protetto dell'Esempio 17, secondo la metodica dell'Esempio 10, utilizzando acido acetico come solvente.

ESEMPIO 19

Preparazione di Z-Asp(OtBu)-Trp-Phe-OH

Il composto è stato preparato secondo la metodica dell'Esempio 15 (metodo a) a partire dal dipeptide dell'Esempio 18.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ:

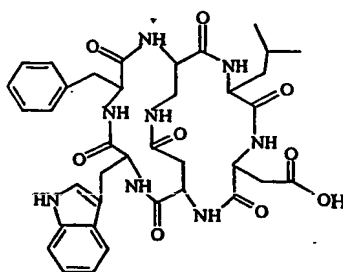
1,35 (s; 3H); 2,21-2,67 (m; 2H); 2,71-3,18 (m; 4H); 4,22-4,58 (m; 3H); 5,00 (AB-Syst.; 2H); 6,87-7,43 (m; 14H); 7,55 (m; 2H); 7,94 (d; 1H); 8,17 (d; 1H); 10,80 (s; 1H); 12,25 (b; 1H).

RIVENDICAZIONI

1. Processo per la preparazione dei composti peptidici biciclici di formula

(I)

Ciclo(Asp(OH)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu)



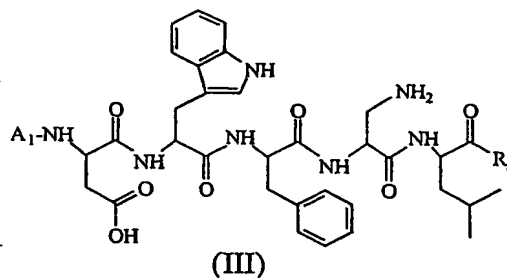
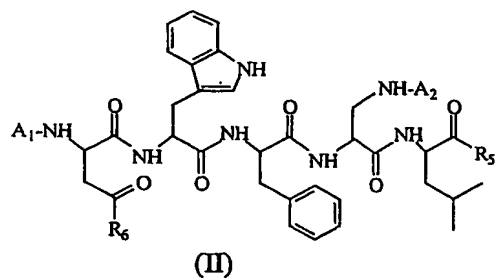
(I)

comprendente i seguenti stadi:

1) deprotezione del pentapeptide lineare di formula (II) in presenza di un solvente per dare il composto di formula (III);

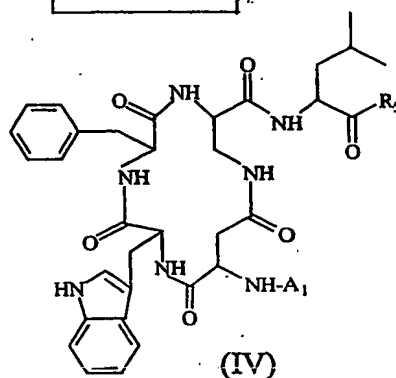
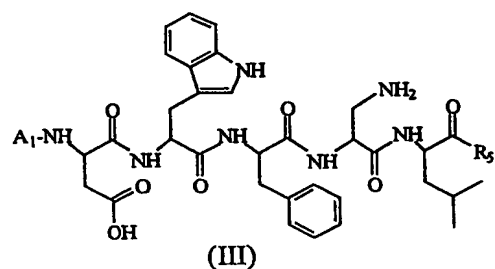
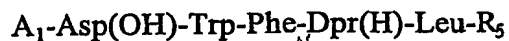
A_1 -Asp(R_6)-Trp-Phe-Dpr(A_2)-Leu- R_5

A_1 -Asp(OH)-Trp-Phe-Dpr(H)-Leu- R_5



in cui A_1 e A_2 sono due gruppi protettivi dell'azoto diversi fra loro, e R_5 ed R_6 , diversi fra loro, sono scelti tra benzilossi e gruppi alchilossi inferiori, in cui la parte alchilica comprende un gruppo C_1 - C_4 lineare o ramificato;

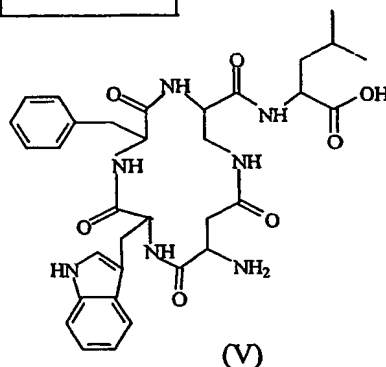
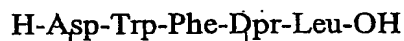
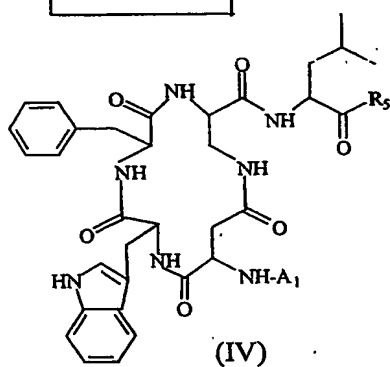
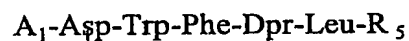
2) ciclizzazione intramolecolare del composto di formula (III) proveniente dallo stadio 1) in presenza di un solvente e di un opportuno agente accoppiante per dare il composto di formula (IV)



in cui R_5 è come sopra definito;

3) deprotezione del composto di formula (IV) proveniente dallo stadio 2)

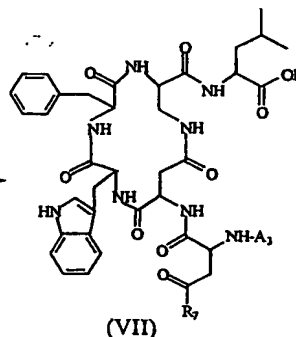
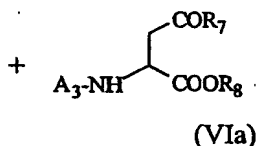
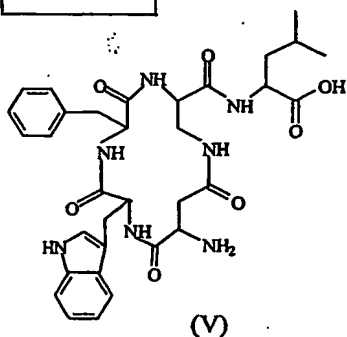
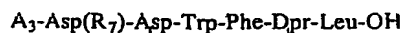
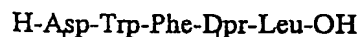
in presenza di un solvente per dare il composto di formula (V)



in cui R_5 è come definito sopra;

4) accoppiamento fra il composto di formula (V) proveniente dallo stadio

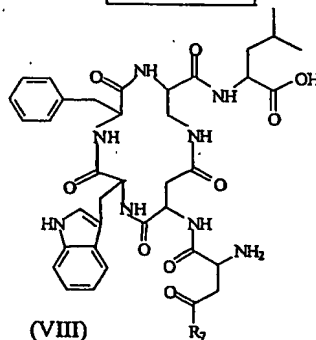
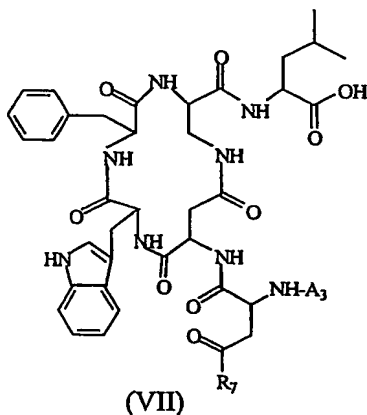
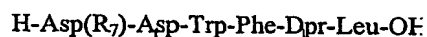
3) ed un amminoacido protetto di formula (VIa) in presenza di un solvente, per dare composti di formula (VII)



in cui A_3 è un gruppo protettivo all'azoto; R_7 è scelto tra benzilossi e gruppi alchilossi inferiori, in cui la parte alchilica comprende un gruppo $\text{C}_1\text{-C}_4$ lineare o ramificato; R_8 è un gruppo residuo derivante da una procedura di attivazione del gruppo carbossilico;

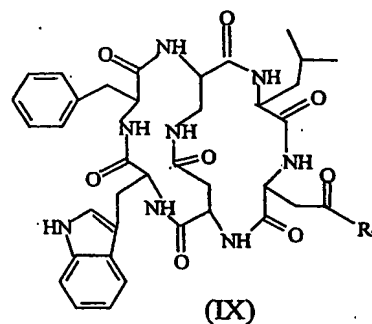
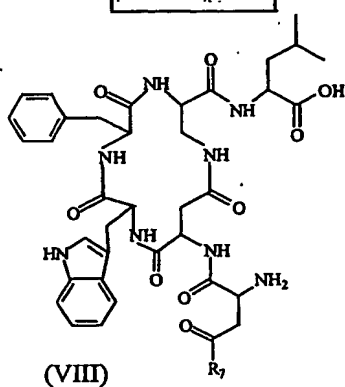
5) deprotezione del composto di formula (VII) proveniente dallo stadio 4)

in presenza di un solvente per dare il composto di formula (VIII)



in cui R_7 è definito come sopra;

6) ciclizzazione intramolecolare, in presenza di un solvente e di un opportuno agente accoppiante, del composto di formula (VIII) proveniente dallo stadio 5) per dare il composto biciclico di formula (IX)

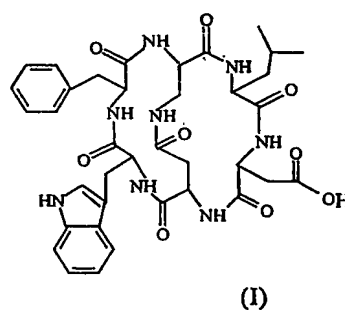
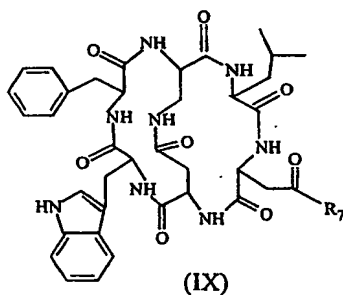
H-Asp(R₇)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu-OHCiclo(Asp(R₇)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu)

in cui R₇ è come definito sopra;

7) deprotezione del composto biciclico di formula (IX) proveniente dallo stadio 6) in presenza di un solvente, per ottenere il composto di formula (I)

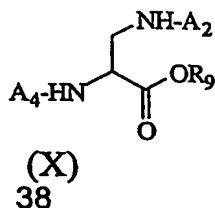
Ciclo(Asp(R₇)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu)

Cyclo(Asp(OH)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu)



in cui R₇ è come definito sopra.

2. Processo secondo la rivendicazione 1, in cui i peptidi lineari di formula (II) sono ottenuti mediante una strategia di accoppiamento sequenziale degli opportuni amminoacidi partendo da un derivato dell'amminoacido Dpr di formula (X), protetto all'azoto e preparato a parte o generato *in situ*



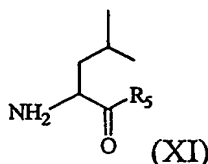
in cui:

A_2 ed A_4 , diversi tra loro, sono gruppi protettivi all'azoto;

R_9 è un gruppo residuo derivante da una procedura di attivazione, preferibilmente scelto nel gruppo costituito da benzilossicarbonile, alchilossicarbonile comprendente nella parte alchilica un gruppo C_1 - C_4 lineare o ramificato, e succinimmidile;

secondo i seguenti passaggi:

- reazione del derivato di formula (X) sopra riportata in presenza di un solvente con un estere della Leu (XI)



in cui R_5 è definito come nella rivendicazione 1, ottenendo il dipeptide A_4 -Dpr(A_2)-Leu- R_5 ,

- deprotezione del dipeptide A_4 -Dpr(A_2)-Leu- R_5 , per ottenere il dipeptide monodeprotetto H-Dpr(A_2)-Leu- R_5 ;

- accoppiamento del dipeptide monodeprotetto H-Dpr(A_2)-Leu- R_5 con l'estere attivato del successivo amminoacido Phe, e così via in sequenza con Trp e Asp, fino ad ottenere i composti di formula (II).

3. Processo secondo le rivendicazioni 1 e 2, in cui i peptidi lineari di formula (II) sono ottenuti mediante una strategia sintetica comprendente i seguenti passaggi:

- accoppiamento del dipeptide monodeprotetto H-Dpr(A₂)-Leu-R₅, ottenuto come descritto nella rivendicazione 2, con un derivato attivato del dipeptide avente la seguente formula (XII)

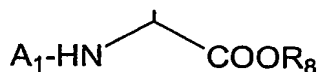


(XII)

in cui A₂ ed A₅, diversi tra loro, sono gruppi protettivi all'azoto, preparato a parte o generato *in situ* tramite accoppiamento di un estere attivato di un Trp protetto all'azoto preparato a parte o generato *in situ*, con un estere della Phe e successiva idrolisi del gruppo estereo, per ottenere il tetrapeptide A₅-Trp-Phe-Dpr(A₂)-Leu-R₅;

- appropriata deprotezione del tetrapeptide A₅-Trp-Phe-Dpr(A₂)-Leu-R₅ dal gruppo legato all'azoto del Trp;

- accoppiamento del tetrapeptide deprotetto con un composto di formula (VI b)



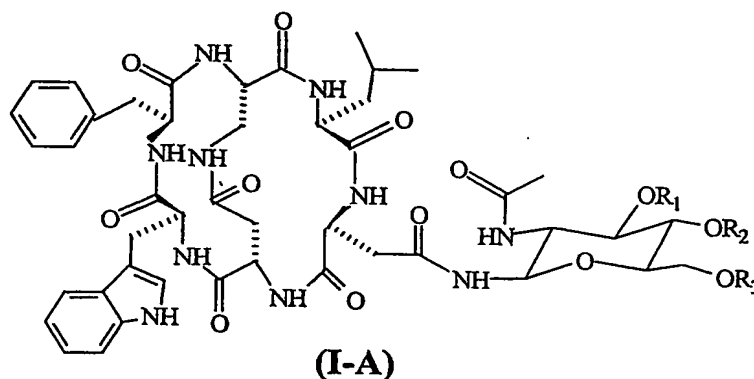
(VI b)

in cui A₁, R₆ ed R₈ sono definiti come nella rivendicazione 1.

4. Processo secondo le rivendicazioni 1-3, in cui i peptidi lineari di formula (II) sono ottenuti mediante una strategia sintetica di tipo 3+2 che prevede l'accoppiamento del tripeptide A₁-Asp(R₆)-Trp-Phe-OH, ottenuto attraverso la rimozione del gruppo protettivo dell'azoto dai composti di formula (XII) sopra riportata, e successivo accoppiamento con un composto di formula (VIb) sopra riportata, viene poi accoppiato con il dipeptide monodeprotetto H-Dpr-(A₂)-Leu-R₅ preparato come descritto nella rivendicazione 2.



5. Processo secondo la rivendicazione 1, in cui detti gruppi protettivi all'azoto sono scelti nel gruppo costituito da benzilossicarbonile e alcossi carbonili in cui la parte alchilica comprende un gruppo C₁-C₄, lineare o ramificato.
6. Processo secondo la rivendicazione 5, in cui detti gruppi protettivi all'azoto sono scelti tra t-butossicarbonile e benzilossicarbonile.
7. Processo secondo la rivendicazione 1, in cui detto gruppo R₈ è scelto nel gruppo costituito da benzilossicarbonile, alchilossicarbonile comprendente nella parte alchilica un gruppo C₁-C₄ lineare o ramificato, succinimmidile, benzotriazolo eventualmente sostituito da alogeno e azabenzotriazolo.
8. Processo secondo le rivendicazioni 1-7, in cui detto gruppo C₁-C₄ lineare o ramificato è scelto nel gruppo costituito da metile, etile, propile, butile, isopropile e t-butile.
9. Processo per la preparazione di composti glicopeptidici biciclici di formula (I-A)

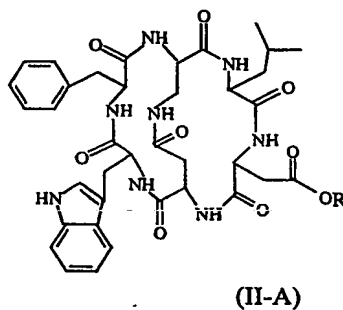
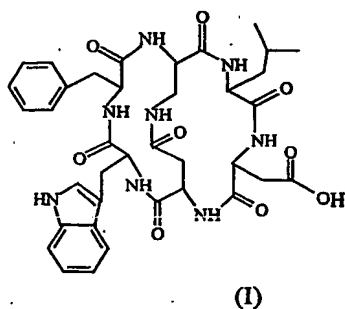


in cui R₁, R₂ e R₃, uguali o diversi fra loro, possono essere idrogeno o un gruppo protettivo all'ossigeno, comprendente i seguenti stadi:

1A) attivazione di composti peptidici biciclici di formula (I) con un adatto agente accoppiante ad ottenere un derivato di formula (II-A)

Ciclo(Asp(OH)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu)

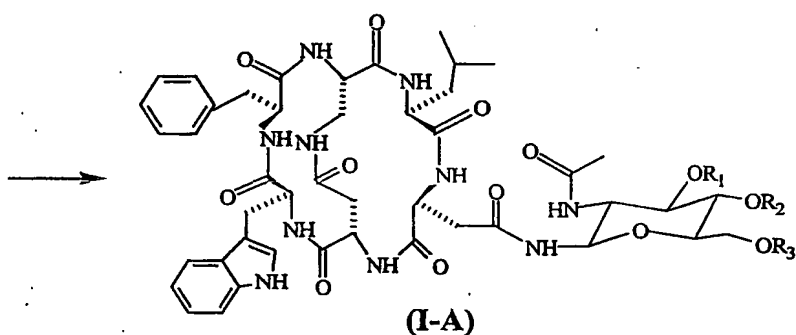
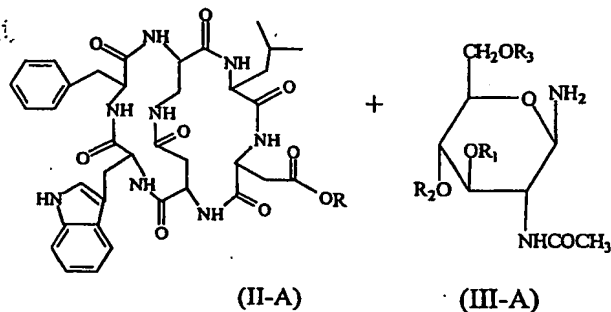
Ciclo(Asp(OR)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu)



in cui R è un gruppo scelto fra benzotriazolo, eventualmente sostituito con alogeno, azabenzotriazolo e succinimidile;

2A) reazione del composto di formula (II-A) proveniente dallo stadio 1A) in presenza di un solvente con un derivato glicosidico di formula (III-A)

Ciclo(Asp(OR)-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu)



in cui R, R₁, R₂, R₃ sono come definiti sopra.

10. Processo secondo la rivendicazione 9, in cui i composti di formula (I-A), in cui R₁, R₂ ed R₃ sono diversi da H, possono essere trasformati nei corrispondenti composti di formula (I-A) in cui R₁=R₂=R₃=H tramite una reazione di deprotezione in presenza di un solvente.

11. Processo secondo la rivendicazione 9, in cui detti gruppi protettivi all'ossigeno sono scelti nel gruppo costituito da -COR₄ dove R₄ è un gruppo alchile C1-C4, lineare o ramificato, fenile eventualmente sostituito con un atomo di alogeno, benzile e benzoile.

12. Processo secondo la rivendicazione 11, in cui detto gruppo alchile C1-C4 è scelto nel gruppo costituito da metile, etile, propile, butile, isopropile e t-butile.

13. Processo secondo la rivendicazione 12, in cui detto gruppo alchile C1-C4 è metile.

14. Processo secondo la rivendicazione 9, in cui detti derivati glicosidici di formula (III-A) sono scelti nel gruppo costituito da 2-acetammido-2-desossi- β -D-glucopiranosilammina e 2-acetammido-3,4,6-tri-O-acetil-2-desossi- β -D-glucopiranosilammina.

15. Processo secondo la rivendicazione 9, in cui detti composti peptidici biciclici di formula (I) sono preparati come descritto nella rivendicazione 1.

16. Processo secondo le rivendicazioni 1 o 9, in cui detto agente accoppiante è scelto nel gruppo costituito da isobutilcloroformiato, carbodiimmidi eventualmente in combinazione con un idrossiderivato, sali di fosfonio, sali di guanidinio N-ossido e sali di uronio.

17. Processo secondo la rivendicazione 16, in cui dette carbodiimmidi sono scelte tra dicicloesilcarbodiimmide e 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide cloridrato; detto idrossiderivato è scelto tra 1-idrossibenzotriazolo, 6-cloro-1-idrossibenzotriazolo, idrossisuccinimmide e 1-idrossi-7-azabenzotriazolo; detti sali di fosfonio, sali di guanidinio N-ossido e sali di uronio sono scelti tra (Benzotriazol-1-ilossi)tris(dimetilammino)fosfonio esafluorofosfato, (Benzotriazol-1-ilossi)tripirrolidino fosfonio esafluorofosfato, 1-[bis(dimetilammino)metilene]-1H-benzotriazolio-3-ossido esafluorofosfato, 1-[bis(dimetilammino)metilene]-5-cloro-1H-benzotriazolio-3-ossido esafluorofosfato, 1-[bis(dimetilammino)metilene]-1H-benzotriazolio-3-ossido tetrafluoroborato,

[bis(dimetilammino)metilene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio-3-ossido
esafluorofosfato, 1-[bis(dimetilammino)metilene]-5-cloro-1H-
benzotriazolio-3-ossido tetrafluoroborato, O-
[(etossicarbonil)cianometilenammino]-N,N,N',N'-tetrametiluronio
tetrafluoroborato, O-(biciclo[2.2.1]ept-5-ene-2,3-dicarbossiimmido)-
N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato e O-(N-succinimmidil)-
N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato.



18. Processo secondo le rivendicazioni 1 o 9, in cui dette reazioni di accoppiamento sono condotte in presenza di un'ammina terziaria in un solvente organico a temperatura compresa tra -20 e $+50^{\circ}\text{C}$.

19. Processo secondo la rivendicazione 18, in cui detta ammina terziaria è scelta nel gruppo costituito da N-metilmorfolina, trietilammina e diisopropiletilammina, e detto solvente organico è scelto nel gruppo costituito da etil acetato, dimetilformammide e N-metilpirrolidone.

20. Processo secondo le rivendicazioni 1 o 10, in cui dette reazioni di deprotezione sono condotte mediante idrogenazione in presenza di un catalizzatore in un solvente scelto tra i solventi che sciolgono i componenti della reazione senza reagire con essi, escludendo i chetoni e i solventi che avvelenano il catalizzatore, ad una temperatura compresa tra -20 e $+50^{\circ}\text{C}$.

21. Processo secondo la rivendicazione 20, in cui detto catalizzatore è scelto tra Palladio al 5% e Palladio al 10%, e detto solvente è scelto tra dimetilformammide, N-metilpirrolidone, acido acetico, acido p-toluen solfonico, metanolo, etanolo, isopropanolo, e loro miscele.

22. Processo secondo le rivendicazioni 1 o 10, in cui dette reazioni di deprotezione sono condotte mediante trattamento acido con acidi puri o con acidi in miscela con altri solventi, a temperatura compresa tra -20 e $+50^{\circ}\text{C}$.

23. Processo secondo la rivendicazione 22, in cui detti acidi sono scelti tra acido cloridrico, acido trifluoroacetico e acido formico.

24. Processo secondo le rivendicazioni 1 o 10, in cui dette reazioni di deprotezione sono condotte mediante trattamento con un composto basico in presenza di un solvente, a temperatura compresa tra -20 e $+50^{\circ}\text{C}$.

25. Processo secondo la rivendicazione 24, in cui detto composto basico è scelto tra idrossidi di metalli alcalini e alcalino terrosi, e detto solvente è scelto nel gruppo costituito da acqua, diossano, acetonitrile, metanolo, etanolo, isopropanolo e loro miscele.

(BRA)



Firenze, 5 Dicembre 2002

p. MENARINI RICERCHE S.p.A.

il Mandatario



Dr.ssa Silvia Brazzini

della NOTARBARTOLO & GERVASI

